

4/7/1

DIALOG(R) File 352:Derwent WPI

(c) 2002 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

011721332

WPI Acc No: 1998-138242/199813

Preparing heat-resistant phosphorylase - comprises culturing microbial host transformed with vector containing gene encoding enzyme at high temperatures

Patent Assignee: EZAKI GLICO CO LTD (EZAKI )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 10014580	A	19980120	JP 96176231	A	19960705	199813 B

Priority Applications (No Type Date): JP 96176231 A 19960705

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 10014580	A		16	C12N-015/09	

Abstract (Basic): JP 10014580 A

Phosphorylase having a substrate specificity for alpha -1,4-glucan or glucose-1-phosphate, optimum temperature 50 deg. C, heat resistance to 60 deg. C and pH stability 6.5 - 11, is new. Also claimed are: (1) a phosphorylase gene having a 798 aa sequence (given in the specification); (2) primers for amplification of (1) having a 29 aa acid sequence (given in the specification), and (3) microbial host transformed with a vector comprising (1).

ADVANTAGE - The enzyme is highly heat resistant.

Dwg. 0/9

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): C12N-009/10; C12N-015/09; C12R-001-07; C12R-001-19

?

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-14580

(43)公開日 平成10年(1998)1月20日

(51)Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09 9/10	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00 9/10	Z N A A
// (C 1 2 N 15/09 C 1 2 R 1:07) (C 1 2 N 9/10	Z N A			

審査請求 未請求 請求項の数21 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-176231	(71)出願人	000000228 江崎グリコ株式会社 大阪府大阪市西淀川区歌島4丁目6番5号
(22)出願日	平成8年(1996)7月5日	(72)発明者	高田 洋樹 兵庫県神戸市須磨区清水台1番8号 1-813
		(72)発明者	鷹羽 武史 兵庫県神戸市北区日の峰4-7-16
		(72)発明者	岡田 茂孝 奈良県生駒市東生駒3丁目207-269
		(72)発明者	今中 忠行 大阪府吹田市藤白台2丁目28番11号
		(74)代理人	弁理士 山本 秀策

(54)【発明の名称】 耐熱性ホスホリラーゼ、およびその製造方法

(57)【要約】

【課題】 耐熱性ホスホリラーゼを提供すること、およびそれを利用したグルコース-1-リン酸または $\alpha$ -グルカンの製造方法の確立

【解決手段】 耐熱性ホスホリラーゼをコードする遺伝子を単離し、高発現可能な発現ベクターに挿入し、大腸菌で発現させることにより、耐熱性ホスホリラーゼを単離する。単離は菌体抽出液を60℃で加熱処理し、遠心分離することにより簡単に行われる。耐熱性ホスホリラーゼを用いて60℃以上の温度で反応させることにより老化と雑菌汚染を伴わない、グルコース-1-リン酸および $\alpha$ -グルカンの製造方法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ホスホリラーゼであって以下の性質：

- 1) 基質特異性： $\alpha$ -1,4-グルカンまたはグルコース-1-リン酸；
- 2) 至適温度：50℃；
- 3) 耐熱性：60℃においても耐熱性であり；および
- 4) pH安定性：pH6.5～11；を有する、ホスホリラーゼ。

【請求項2】 配列表の配列番号1の1位のMetから798位のMetまでのアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のホスホリラーゼ。

【請求項3】 配列表の配列番号1の1位のMetから798位のMetまでのアミノ酸配列中の1またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換、あるいは付加による変異を有するホスホリラーゼであって、該変異を含むホスホリラーゼが、該変異を含まないホスホリラーゼと同等またはそれ以上の比活性および耐熱性を有する、請求項1に記載のホスホリラーゼ。

【請求項4】 前記ホスホリラーゼが、バチルス ステアロサーモフィラスTRBE14株由来である、請求項1に記載のホスホリラーゼ。

【請求項5】 請求項2または3のいずれかの項に記載のホスホリラーゼであって、比活性が大腸菌ホスホリラーゼよりも高い、ホスホリラーゼ。

【請求項6】 前記比活性が大腸菌グリコーゲンホスホリラーゼの少なくとも9倍である、請求項2または3のいずれかの項に記載のホスホリラーゼ。

【請求項7】 配列表の配列番号1の1位のMetから798位のMetまでのアミノ酸配列をコードする配列を含む、ホスホリラーゼ遺伝子。

【請求項8】 前記ホスホリラーゼ遺伝子が配列表の配列番号4に記載のDNA配列である、ホスホリラーゼ遺伝子。

【請求項9】 配列表の配列番号1の1位のMetから798位のMetまでのアミノ酸配列中の1またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換、あるいは付加による変異を有するホスホリラーゼであって、該変異を含むホスホリラーゼが、該変異を含まないホスホリラーゼと同等またはそれ以上の比活性および耐熱性を有するホスホリラーゼをコードする遺伝子。

【請求項10】 配列表の配列番号2および3のプライマーのセットを用いてPCRにより増幅される、ホスホリラーゼ遺伝子を含むDNA。

【請求項11】 請求項7～10のいずれかの項に記載の耐熱性ホスホリラーゼ遺伝子を含有する発現ベクター。

【請求項12】 請求項11に記載の発現ベクターで形質転換された微生物。

【請求項13】 前記微生物が原核生物である、請求項12に記載の形質転換微生物。

【請求項14】 前記微生物が中温菌である、請求項1

2に記載の形質転換微生物。

【請求項15】 前記原核生物が*Escherichia coli*である、請求項13に記載の形質転換微生物。

【請求項16】 請求項11に記載の形質転換された微生物を培養する工程、60℃以上に加熱する工程、および該培養により生産されたホスホリラーゼを回収、精製する工程を含む、耐熱性ホスホリラーゼの製造方法。

【請求項17】 前記形質転換された微生物が中温菌である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 前記形質転換された微生物が*Escherichia coli*である、請求項16に記載の方法。

【請求項19】 請求項16に記載の方法によって回収、精製されたホスホリラーゼ。

【請求項20】 請求項1ないし3のいずれかの項に記載のホスホリラーゼを用いて $\alpha$ -グルカンを加リン酸分解する工程を含む、グルコース-1-リン酸を生成する方法。

【請求項21】 糖類およびグルコース-1-リン酸を基質として、請求項1ないし3に記載のホスホリラーゼを作用させる工程を含む、 $\alpha$ -グルカンの合成方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本願発明は、新規な耐熱性のホスホリラーゼ、このホスホリラーゼをコードする遺伝子、このホスホリラーゼを発現する発現ベクター、このホスホリラーゼの製造方法、および耐熱性のホスホリラーゼを用いるグルコース-1-リン酸ならびに $\alpha$ -グルカンの製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ホスホリラーゼ(EC.2.4.1.1)は、馬鈴薯塊茎などの植物、ウサギ筋肉などの動物、酵母などの微生物等に広く分布していることが知られている。そしてホスホリラーゼは、医療用抗菌剤、抗腫瘍剤(白金錯体)、心臓病の治療薬(アミン塩)、および $\alpha$ -グルカン合成の基質として有用であるグルコース-1-リン酸(「G-1-P」)とも略称される)を合成する際に有用な酵素である。

【0003】さらに、ホスホリラーゼは、アミロースなどの $\alpha$ -グルカンを合成する際にも有用である。例えば、図1に記載のように、ホスホリラーゼをグルコース-1-リン酸とマルトペンタオース等の糖類との混合物に作用させることによって、逆合成反応により $\alpha$ -グルカンが合成される。得られた $\alpha$ -グルカンは、サイクロアミロースをはじめとする有用糖質の合成の基質として使用されている。

【0004】グルコース-1-リン酸の製造、あるいは $\alpha$ -グルカンの製造には、おもに馬鈴薯由来のホスホリラーゼが用いられている。これは、比較的大量の酵素が得易いことによる。大腸菌(*Escherichia coli*)由来のホスホリラーゼも、その遺伝子が単離されていることから、大量に製造されている。

【0005】 $\alpha$ -グルカン加工において工業的に酵素を使用する場合は、基質である $\alpha$ -グルカンの老化を抑制し、および雑菌汚染を防止するために、60℃以上で反応を行うことが望ましいとされている。しかし、これらの酵素は全て30℃～45℃程度の中温域で高い活性を有する酵素であり、60℃以上の高温には用いられない。例えば、大腸菌由来のホスホリラーゼ酵素の反応至適温度は30℃であり(Weinhusel *糖糖AEnzyme and Microbial Technology* 17, 140-146 (1994))、馬鈴薯由来のホスホリラーゼ酵素の反応至適温度は40℃であり(喜多ら、特開平2-231092)、およびウサギ筋肉由来のホスホリラーゼ酵素の反応至適温度は30℃である(Nakataniら、*J. Appl. Biochem.* 5, 371-374 (1983))。最も反応至適温度の高いホスホリラーゼでも、その温度は高くとも45℃程度である(Weinhusel *糖糖AApp. Microbiol, Biotechnol* (1994) 41, 510-516)。

【0006】そのため、雑菌の汚染および $\alpha$ -グルカンの老化が生じ、グルコース-1-リン酸を効率よく製造できないという問題点は解決されていないままである。

【0007】また、ホスホリラーゼの逆反応を利用してアミロースなどの $\alpha$ -グルカンを作る場合にも、雑菌汚染や生産物である $\alpha$ -グルカンの老化を防止するために60℃以上の温度で反応を行うことが望ましい。

【0008】そこで、60℃の反応温度においても、活性を有する耐熱性の酵素の単離が必要とされてきた。

【0009】ところで、大腸菌(以下、*E. coli*ということもある)は2種のホスホリラーゼを有し、それぞれ、マルトデキストリンホスホリラーゼ(MalP)およびグリコーゲンホスホリラーゼ(GlgP)と呼ばれている。細菌のGlgPの比活性が他のホスホリラーゼに比べて極端に低いことは特徴的である。これは、増殖に不適切な条件下で蓄積したグリコーゲンを徐々に分解するため、細菌においては比活性の低いGlgPが必要とされるからであると考えられている(Yuら、*J. Biol. Chem.* 263, 13706-13711, 1988)。

【0010】バチルス属細菌においては、バチルス サチルス(*Bacillus subtilis*)からGlgP遺伝子と相同性を有する遺伝子が単離されている(Kielら、*Mol. Microbiol.* 11, 203-218, 1994)。この遺伝子はグリコーゲン生合成系遺伝子群の最後に存在していることが知られている(図2(a)を参照)が、大腸菌のMalPに相当する遺伝子が存在するかどうかは明らかでない。

【0011】他方、バチルス属の微生物においては好熱性菌が存在する。しかし好熱菌において、図2(a)に示されるようなバチルス サチルスと同様のグリコーゲン生合成系遺伝子群が存在しているかどうかは不明であり、他属の好熱性細菌においても同様に、そのようなグリコーゲン生合成系遺伝子群が存在するかどうかについては、全く不明であった。

【0012】例えば、バチルス ステアロサーモフィラ

ス(*Bacillus stearothermophilus*)CU21株の場合には、そのグリコーゲン生合成系遺伝子群は挿入配列によって分断されており、機能していない(Kielら、*DNA Seq. - J. DNA Seq. Map.* 4, 1-9, 1993)。またバチルス ステアロサーモフィラス1503-4R var. 4株では、グリコーゲン生合成系に属する遺伝子であるブランチングエンザイム遺伝子が単離されているが、その下流において意味のある塩基配列は現在のところ発見されていない(Kielら、*Mol. Gen. Genet.*, 230, 136-144, 1991)。さらに、バチルス カルドリティカスではブランチングエンザイム遺伝子の下流に、図2(a)に示されるバチルス サチルスと同様のグリコーゲン生合成系遺伝子群と良く似た遺伝子の1部が存在することが発見されたが、ホスホリラーゼ遺伝子が存在するかどうかは不明である(Kielら、*Seq. - J. DNA Seq. Map.* 3, 1-9, 1992)。

【0013】そのさらに下流にホスホリラーゼ遺伝子が存在したとしても、バチルス ステアロサーモフィラスCU21株の例から考えられるように、ホスホリラーゼ遺伝子が分断されている可能性がある。またブランチングエンザイム自身に耐熱性がない(Kielら、*Seq. - J. DNA Seq. Map.* 3, 1-9, 1992)ため、ホスホリラーゼ遺伝子が完全な形で存在したとしても、そのホスホリラーゼが耐熱性を有するかどうかは不明であった。

【0014】さらに、大腸菌において、GlgPはグリコーゲン合成自体には不要であるとされているため、グリコーゲンを合成する好熱菌においてもバチルス サチルスのようなホスホリラーゼを有するグリコーゲン生合成系遺伝子群が存在するかどうかは不明であった。またホスホリラーゼが得られたとしても、大腸菌の場合のように極端に比活性が低い可能性が考えられた。

【0015】従って、耐熱性のホスホリラーゼが産業的にも必要とされていたのにもかかわらず、その存在は不明であり、そしてこの耐熱性酵素の単離は、当業者の課題であった。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】本願発明は上記の問題を解決するためのものであり、その目的とするところは：

- (1) 耐熱性ホスホリラーゼをコードする遺伝子を単離すること；
- (2) 高発現可能な発現ベクターに挿入したものを、微生物などの適切な宿主に導入することにより、上記ホスホリラーゼを生産する組換え体を得ること；
- (3) 本酵素遺伝子が大腸菌などの中温菌を宿主として発現させることによって、耐熱性ホスホリラーゼを含む得られた菌体抽出液を60℃で加熱処理することにより、夾雑酵素を簡単に除き得、精製の面においても有利であるような、ホスホリラーゼ酵素の製造方法を確立すること；あるいは
- (4) 耐熱性ホスホリラーゼを用い、高い温度で反応さ



せることにより従来の問題点を克服するグルコース-1-リン酸あるいは $\alpha$ -グルカンの製造方法を確立することにある。

【0017】

【課題を解決するための手段】本願発明のホスホリラーゼは、基質特異性として $\alpha$ -1,4-グルカンを分解してグルコース-1-リン酸を生成する作用を有し、至適温度が50℃であり、60℃においても耐熱性であり、pH6.5～11の範囲で安定である性質を含む。

【0018】好ましい実施態様においては、配列表の配列番号1の1位のMetから798位のMetまでのアミノ酸配列を有する。

【0019】好ましい実施態様においては、配列表の配列番号1の1位のMetから798位のMetまでのアミノ酸配列中の1またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換、あるいは付加による変異を有するホスホリラーゼであって、該変異を含むホスホリラーゼが、該変異を含まないホスホリラーゼと同等またはそれ以上の比活性および耐熱性を有する。

【0020】好ましい実施態様においては、前記ホスホリラーゼが、バチルス ステアロサーモフィラスTRBE14株由来である。

【0021】好ましい実施態様においては、大腸菌ホスホリラーゼよりも高い比活性を有する。

【0022】好ましい実施態様においては、前記比活性が大腸菌グリコーゲンホスホリラーゼの少なくとも9倍である。

【0023】また、本願発明は、配列表の配列番号1の1位のMetから798位のMetまでのアミノ酸配列をコードするホスホリラーゼ遺伝子に関する。

【0024】好ましい実施態様においては、ホスホリラーゼ遺伝子は配列表の配列番号4に記載のDNA配列である。

【0025】好ましい実施態様においては、配列表の配列番号1の1位のMetから798位のMetまでのアミノ酸配列中の1またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換、あるいは付加による変異を有するホスホリラーゼであって、該変異を含むホスホリラーゼが、該変異を含まないホスホリラーゼと同等またはそれ以上の比活性および耐熱性を有する、ホスホリラーゼ遺伝子である。

【0026】好ましい実施態様においては、本願発明のヌクレオチド配列は配列表の配列番号2および3のプライマーのセットを用いてPCRにより増幅され得る。

【0027】さらに本願発明は、耐熱性ホスホリラーゼ遺伝子を含有する発現ベクターに関する。

【0028】また、本願発明は、発現ベクターで形質転換された微生物に関する。

【0029】好ましい実施態様においては、前記微生物は中温菌である。

【0030】好ましい実施態様においては、前記微生物

が原核生物である。

【0031】好ましい実施態様においては、前記原核生物は*Escherichia coli*である。

【0032】さらに本願発明は、形質転換された微生物を培養する工程、60℃以上に加熱する工程、および該培養により生産されるホスホリラーゼを回収、精製する工程を含む、耐熱性ホスホリラーゼの製造方法に関する。

【0033】好ましい実施態様においては、前記形質転換された微生物は中温菌である。

【0034】好ましい実施態様においては、前記形質転換された微生物は*Escherichia coli*である。

【0035】本願発明は、回収、精製されたホスホリラーゼに関する。

【0036】好ましい実施態様においては、回収、精製された耐熱性ホスホリラーゼは、至適温度が50℃であり、60℃においても耐熱性であり、pH6.5～11の範囲で安定である性質を含む。

【0037】また本願発明は、無機リン酸またはグルコース-1-リン酸で安定化される、ホスホリラーゼに関する。

【0038】好ましい実施態様においては、本願発明のホスホリラーゼは、60mMのグルコース-1-リン酸の存在下では70℃で30分間加熱した後も約50%活性が残存する。

【0039】好ましい実施態様においては、1Mリン酸存在下において60℃で $\alpha$ -グルカン分解反応を行った場合、1時間後も反応速度の低下が見られない。

【0040】好ましい実施態様においては、前記ホスホリラーゼは大腸菌ホスホリラーゼよりも高い比活性を有する。

【0041】好ましい実施態様においては、本願発明のホスホリラーゼの前記比活性は大腸菌のグリコーゲンホスホリラーゼの少なくとも9倍である。

【0042】本願発明は、また耐熱性ホスホリラーゼを用いて $\alpha$ -グルカンを加リン酸分解することにより、グルコース-1-リン酸を製造する方法に関する。

【0043】また、本願発明は、糖類およびグルコース-1-リン酸を基質として、請求項1ないし3に記載のホスホリラーゼを作用させる工程を含む、 $\alpha$ -グルカンの合成方法に関する。

【0044】好ましい実施態様においては、前記ホスホリラーゼを、60℃より高い温度で反応させることにより生成する $\alpha$ -グルカンの沈澱、および雑菌汚染を防止して生成物である $\alpha$ -グルカンの老化を防止する。

【0045】好ましい実施態様においては、前記 $\alpha$ -グルカンはアミロースである。

【0046】

【発明の実施の形態】以下、本願発明を詳しく説明する。

【0047】本願発明において「好熱性菌」とは、生育至

適温度が50℃～105℃で、30℃以下ではほとんど増殖しない微生物を意味し、このうち90℃以上の至適温度を持つ微生物を超好熱性菌と定義する。

【0048】本願発明において、「中温菌」とは、生育温度が通常の温度環境にある微生物のことであり、特に最適生育温度が20℃～40℃である微生物をいう。

【0049】本願発明において、「60℃においても耐熱性がある」とは、0.1M 3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)の緩衝液(pH7.0)中で60mMのグルコース-1-リン酸が存在する条件下、60℃で30分処理したときに80%以上の活性が残存することをいう。

【0050】本願発明において「pH6.5～11の範囲で安定である」とは、図5に記載のそれぞれの緩衝液(50mM)中における各pHで40℃の条件下、40分間処理したときに95%以上の活性が残存することをいう。

【0051】本願発明において「ホスホリラーゼ活性」は、100mM MOPS(pH7.0)、45mMグルコース-1-リン酸、1%(w/v)可溶性からなる $\alpha$ -グルカン組成液中で、ホスホリラーゼを、40℃で30分間、作用させたときに生じる無機リン酸を定量することによって、測定される。1分間に1 $\mu$ モルの無機リン酸を生じる活性を1ユニットとする。

【0052】本願発明において「 $\alpha$ -グルカン」とは、 $\alpha$ -1,4-グルカンのことであり、デンプン、アミロース、グリコーゲンなどを含む。

【0053】本願発明は、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列、あるいは配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列中の1またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換、あるいは付加により変異を含むホスホリラーゼであって、この変異を含むホスホリラーゼが変異を含まないホスホリラーゼと同等またはそれ以上の活性および耐熱性を有するホスホリラーゼである。このような変異は、天然に生じるか、あるいは変異原物質の作用または人為的に部位特異的突然変異導入を用いて生じさせ得る。また変異の導入の結果、変異を含まないホスホリラーゼと同等またはそれ以上の活性および耐熱性を有し得る。

【0054】組換えによる生産能力の向上は、目的遺伝子のクローン化およびクローン化された遺伝子の発現により達成される。

【0055】耐熱性のあるホスホリラーゼ遺伝子はバチルス ステアロサーモフィラスTRBE14株のブランチングエンザイム遺伝子の配列(Takataら、Appl. Environ. Microbiol. 60, 3096-3104, 1994)をもとに、染色体DNAからIPCR法(「細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ2植物のPCR実験プロトコル、秀蘭社」を参照のこと)を用いて順次下流側に存在するDNAフラグメントを取得することにより、得られ得る。さらに、このDNAフラグメントの塩基配列を基に合成されたプライマーを用い、バチルス ステアロサーモフィラスTRBE14株の染色体DNAなどを鋳

型に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて直接ホスホリラーゼ遺伝子を増幅し得る。

【0056】なお、バチルス ステアロサーモフィラスTRBE14株は工業技術院に受託番号FERM P-13916として寄託されている。

【0057】クローン化された遺伝子の配列は、クローン化DNAを挿入した適切なベクターの構築、発現ベクターの微生物への導入、ならびに組換え微生物の培養および生産物の回収により達成される。これらの方法は、当業者に周知である。

【0058】本願発明に用いられる宿主微生物には、原核生物および真核生物が含まれ、中温菌が好ましい。特に好ましい微生物としては、例えば大腸菌などが挙げられるが、これに限定されない。

【0059】発現ベクターは、目的の遺伝子が転写および翻訳されるように作動可能に連結されており、さらに必要に応じて微生物内での複製および組換え体の選択に必要な因子を備えた媒体をいう。また、発現産物の分泌生産が意図される場合は、分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列が、目的のタンパク質をコードするDNAの上流に正しいリーディングフレームで結合される。発現ベクターの種類が使用する微生物宿主に応じて代わり得ることは、当業者に周知である。

【0060】好ましい発現ベクターとしては、大腸菌中でも発現可能なpTrc99A(ファルマシア製)などが挙げられる。

【0061】上記発現ベクター内の転写および翻訳に必要な因子に作動可能に連結するために、目的のホスホリラーゼ遺伝子を加工しなければならない場合がある。これらは例えばプロモーターとコード領域との間が長すぎて転写効率の低下が予想される場合、またはリボゾーム結合部位と翻訳開始コドンとの間隔が適切でない場合などである。加工の手段としては、制限酵素による消化、Bal31、ExoIIIなどのエキソヌクレアーゼによる消化、あるいはM13などの一本鎖DNAまたはPCRを使用した部位特異的突然変異の導入が挙げられる。

【0062】発現ベクターを導入してホスホリラーゼ生産能力を獲得した形質転換株による目的遺伝子の生産は、使用する宿主微生物および発現ベクター内の発現を調節する因子の種類、ならびに発現される物質に応じて適切な条件が選択される。例えば、通常の振とう培養方法が用いられ得る。

【0063】用いる培地は、使用される宿主微生物が生育するものであれば特に限定されない。

【0064】培地には炭素源、窒素源の他、無機塩、例えば、リン酸、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 、 $K^{+}$ 等の塩が必要に応じて、適宜混合して、または単独で用いられ得る。また、必要に応じて形質転換体の生育、酵素の生産に必要な各種無機物、有機物が添加され得る。

【0065】培養の温度は用いる形質転換体の生育に適した温度を選択し得る。通常15℃～60℃である。本願発明の好ましい実施態様において中温菌を使用する場合、25℃～40℃での培養が好ましい。また、形質転換株の培養は、ホスホリラーゼの生産のために十分な時間続行されるが、本願発明の好ましい実施態様では、培養時間は24時間程度である。

【0066】誘導性のプロモーターを有する発現ベクターを使用する場合は、誘導物質の添加、培養温度の変更、培地成分の調整などにより発現が制御され得る。例えば、ラクトース誘導性プロモーターを有する発現ベクターを使用する場合は、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加することにより発現が誘導され得る。

【0067】このようにして培養した後、例えば培養物を遠心分離または濾過することによって形質転換体を分離して上清を得る。次に、このホスホリラーゼを含む上清を通常の手段(例えば、塩析法、溶媒沈澱、限外濾過)を用いて濃縮し、ホスホリラーゼを含む画分を得る。この画分を濾過、あるいは遠心分離、脱塩処理などの処理を行い粗酵素液を得る。さらにこの粗酵素液を、凍結乾燥、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、晶出などの通常の酵素の精製手段を適宜組み合わせることによって、比活性の向上した粗酵素あるいは精製酵素が得られる。α-アミラーゼ等のα-グルカン分解する酵素、およびホスファターゼ等のグルコース-1-リン酸を分解する酵素が含まれていなければ、その粗酵素がそのまま以後の反応に用いられ得る。

【0068】本願発明の耐熱性ホスホリラーゼ遺伝子は大腸菌などの中温菌で発現させた場合、ホスホリラーゼは簡便に精製され得る。簡単に述べると、ホスホリラーゼを含む菌体抽出液を60℃で加熱処理することにより、夾雑酵素が不溶化する。この不溶化物を遠心分離などで除去して透析処理を行えばよい。

【0069】精製された耐熱性ホスホリラーゼを用いてα-グルカン分解しグルコース-1-リン酸を生産し得る。この際、ホスホリラーゼを、固定化酵素としても使用し得る。

【0070】反応温度は40℃以上、好ましくは50℃～70℃、特に好ましくは60℃であり、このことにより、基質であるα-グルカンの老化および雑菌汚染が防止され得る。

【0071】グルコース-1-リン酸の生産は、無機リン酸溶液を含むα-グルカン溶液中で、本願発明のホスホリラーゼを作用させることにより行い得る。

【0072】ホスホリラーゼは、α-グルカンの非還元末端からグルカンを加リン酸分解してグルコース-1-リン酸を生成するが、α-1,6-グルコシル結合が基質に存在する場合、その4残基手前で過リン酸分解反応が停止する。従って、α-グルカンから効率よくグルコース-1-

リン酸の生産を行う場合、予めα-1,6-結合を切断しておくか、またはホスホリラーゼ反応と同時にα-1,6-結合を切断する酵素を添加し得る。例えば、コーンスターチのα-1,6-結合を切断した短鎖長アミロースが用いられ得る。短鎖長アミロースを使用する場合、ホスホリラーゼによる加リン酸分解は、マルトテトラオースを残して停止するため、グルコース-1-リン酸の理論的限界収率は78%である。

【0073】本願発明のホスホリラーゼは、α-グルカンの分解のみならず、生成にも用いられ得る。この際、ホスホリラーゼを、固定化酵素としても使用し得る。

【0074】反応温度は40℃以上、好ましくは50℃～70℃、特に好ましくは60～70℃であり、このことにより、雑菌汚染が防止され得る。

【0075】本願発明のホスホリラーゼの基質として使用され得る糖類は、非還元末端を有する重合度4以上のα-グルカンである。

【0076】糖類を基質として反応させる場合、生じるα-グルカンの分子量は、例えば下記の反応式と式(1)を用いて算出し得る。

【0077】

反応式： $nG-1-P + G(5) \rightarrow nPi + G(5+n)$

ここで、G-1-Pはグルコース-1-リン酸であり、G(5)はマルトペンタオース(5は重合度を表す)であり、G(5+n)は生じるアミロース(5+nは重合度を表す)である。

【0078】式(1)：生成物の平均重合度=(生じるリン酸のモル数/初発マルトペンタオロースのモル数) + 5

α-グルカンの生産は、例えば終濃度0.1mMのマルトペンタオースを反応プライマーとして含むクエン酸緩衝液(pH7.0)中で、グルコース-1-リン酸にホスホリラーゼを作用させることにより行い得る。本願発明のホスホリラーゼを用いた場合、長時間十分に反応が進行し、また生成物の沈澱も生じない。

【0079】反応液中のpHにより、またはホスホリラーゼの起源により若干変動があるが、反応の平衡に達する場合、グルコース-1-リン酸とリン酸との濃度比が1:3.6～4.5の濃度比になる(Fletcher, R. J., Ann. Rev. Biochem. 1980 49, 31-61: およびWeinhauselら, Enzyme and Microbial Technology 1994 17, 140-146)。本願発明のホスホリラーゼにおいても、この比はほぼ上述のようである。従って、グルコース-1-リン酸とリン酸との濃度比により、ホスホリラーゼを合成反応または分解反応のいずれかに作用させるかを調節することが可能である。

【0080】

【実施例】以下に具体的に実施例を用いて説明するが、本願発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0081】(実施例1:耐熱性ホスホリラーゼ遺伝子の単離、および耐熱性ホスホリラーゼ発現用プラスミド



の作製)

#### (1) ホスホリラーゼ遺伝子の単離

目的の遺伝子である耐熱性のあるホスホリラーゼ遺伝子のクローン化のために、本願発明者らは、バチルス ステアロサーモフィラス TRBE14株のブランチングエンザイム遺伝子の配列(Takataら、Appl. Environ. Microbiol. 60, 3096-3104, 1994)をもとに、染色体DNAからIPCR法(「細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ2植物のPCR実験プロトコール、秀潤社」を参照)を用いて順次下流側に存在するDNAフラグメントを取得した。そのDNA領域の模式図を図2(b)に示す。塩基配列解析の結果図2(b)に示した位置にホスホリラーゼ遺伝子がコードされていることが明らかとなった。結果的にバチルス サチルス グリコーゲン生合成系遺伝子群の構造と良く似ていたが、各遺伝子の相同性は60%前後であり、オーバーラップの度合いも微妙に異なっていた。また、グリコーゲン生合成系遺伝子群のさらに上流の構造は全く異なっていた。従って、バチルス サチルスがホスホリラーゼ遺伝子を含むグリコーゲン生合成系遺伝子群を有している事実から、直ちにバチルス ステアロサーモフィラスが同様のグリコーゲン生合成系遺伝子群を有するとの想像はできないことが、当業者に理解される。

#### 【0082】(2) 耐熱性ホスホリラーゼ遺伝子のクローン化

配列表の配列番号1に示した塩基配列に基づいて、オリゴヌクレオチド、プライマー-N(配列番号2)、プライマー-C(配列番号3)を合成した。20pmolのプライマー-N、20pmolのプライマー-C、0.2μgのバチルス ステアロサーモフィラス TRBE14株染色体(GENOME DNA ISOLATION KIT(BIO101社製)を用いて調製)、Ex-Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造製)を0.5ユニット、10mlの×10反応用緩衝液、各20nmolのデオキシNTPを含む反応液100μlを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を実施した。PCRは、94℃、1分間の加熱の後、98℃20秒、53℃1分、68℃2分のサイクルを30回繰り返し、最後に、72℃で10分加熱する条件で実施した。その結果、耐熱性ホスホリラーゼ遺伝子を含む約2.5kbpのDNAフラグメントが増幅された。このDNAフラグメントを制限酵素、EcoRIとPstIで切断した後、アガロースゲル電気泳動で精製し、ベクターpTrc99A(ファルマシア製)の同制限酵素切断点に組み込み、耐熱性ホスホリラーゼ発現用プラスミドpTGP91を得た。

【0083】(実施例2：耐熱性ホスホリラーゼの活性測定)活性は、グルコース-1-リン酸とα-グルカンに反応させたときに生じる無機リン酸をSahekiらの方法(Anal. Biochem. 148, 277-281 (1985))で定量することにより、以下のように測定した。100mM MOPS(pH7.0)、45mM グルコース-1-リン酸、1%(w/v)可溶性デンプンの組成からなる反応液(200μl)を、40℃で30分間保温した後、亜鉛モリブデン溶液(100mM 酢酸亜鉛、15mM モリブデン

酸アンモニウム(pH5.0))を添加し、反応を停止した。これにアスコルビン酸溶液(溶液中の10%アスコルビン酸(pH5))を200μl添加し、30℃で15分間保温した後、850nmの吸光度を測定した。1分間に1μmolのリン酸を遊離する酵素量を1ユニットとし、活性のユニットを算出した。

#### 【0084】(実施例3：耐熱性ホスホリラーゼの精製)

プラスミドpTGP91を含有する大腸菌TG-1株の全培養液10ミリリットルを、1リットルのL培地(50μg/mlアンピシリンを含む)を含む2リットル容坂口フラスコに添加し、37℃で振とうした。2.5時間後、終濃度1mMのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドおよび1mMのピリドキシンを添加し、さらに21.5時間37℃で培養を続けた。菌体を遠心分離により集め、20mM Tris-HCl(pH7.5)(以下、緩衝液Aという)で洗浄した後、同緩衝液に再び懸濁して、超音波処理を行った。これを、遠心分離して上清を粗酵素液とした。粗酵素液を60℃で1時間処理して不溶物を除き緩衝液Aに対して透析した。透析内液を緩衝液Aで平衡化したQ-セファロースカラム(ファルマシア製)にロードして、100mM NaClを含む緩衝液Aで洗浄した。耐熱性ホスホリラーゼは、500mM NaClを含む緩衝液で溶出した。

【0085】得られた酵素液に終濃度300mMになるように、硫酸アンモニウムを添加した後、300mM硫酸アンモニウムを含む緩衝液Aで平衡化したフェニルトヨパールカラム(TOSOH製)にロードした。150mM硫酸アンモニウムを含む緩衝液Aで洗浄した後、緩衝液Aで耐熱性ホスホリラーゼを溶出した。これを、緩衝液Aで平衡化したSource15Qカラム(ファルマシア製)にロードし、緩衝液A中のNaCl濃度を100mMから500mMに変化させることによって酵素を溶出した。

【0086】得られた酵素液に終濃度300mMになるように、硫酸アンモニウムを添加した後、300mM硫酸アンモニウムを含む緩衝液Aで平衡化したResourcePheカラム(ファルマシア製)にロードし、緩衝液Aで洗浄し、耐熱性ホスホリラーゼを蒸留水を流すことにより溶出した。得られた酵素液に終濃度20mMになるようにTris-HCl(pH7.0)緩衝液を添加し、精製酵素液とした。精製酵素はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドを示した(図3)。

【0087】(実施例4：耐熱性ホスホリラーゼの比活性)実施例3で精製した耐熱性ホスホリラーゼを用いて、本酵素の比活性を測定した。比活性は1.82ユニット/mgであった。実施例2で示した方法において、可溶性デンプンをグリコーゲン(ウサギ肝臓由来、ペーリンガー・マンハイム製)に置換して測定した場合には3.45ユニット/mgであった。この比活性は、大腸菌グリコーゲンホスホリラーゼの比活性(0.19ユニット/mg、Yuら、J. Biol. Chem. 263, 13706-13711, 1988)に比べると約9～18倍であった。



【0088】(実施例5：耐熱性ホスホリラーゼの性質) 実施例3で精製した耐熱性ホスホリラーゼの本酵素の酵素学的性質を、当業者に周知の方法を用いて分析した。本酵素の反応至適pHは6.5～7であり(図4)、pH6.5～11の範囲で安定であった(図5)。また、反応至適温度は50℃であり(図6)、45℃まで安定であった(図7)。さらに、本酵素は無機リン酸やグルコース-1-リン酸で安定化された。例えば、60mMのグルコース-1-リン酸存在下では70℃、30分間の加熱後も約50%の活性が残存した。また1Mリン酸存在下において60℃で反応を行ったところ、1時間後も反応速度の低下は観察されなかった。

【0089】(実施例6：グルコース-1-リン酸の生産) 50mgのモチトウモロコシデンプンを10mlの1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に懸濁し、沸騰水浴中で20分間加熱することによって溶解させた。これを、60℃まで冷却し、実施例3で精製した耐熱性ホスホリラーゼを0.13ユニット添加した。経時的にサンプリングし、グルコース-1-リン酸を定量した。グルコース-1-リン酸の定量は、Weinhusel *糖糧AEnzyme and Microbial Technology* 17, 140-146 (1994) に記述される酵素的方法に本質的に従い、以下のように実施した。

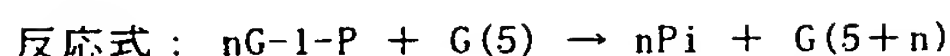
【0090】80μlのサンプルに80μlの1M Tris-HCl(pH7)、50mM MgCl<sub>2</sub>と640μlの蒸留水を添加した。これに、400μlの検出用試薬溶液(10mM Tris-HCl(pH7)、1.8μmol/ml NAD<sup>+</sup>、30nmol/ml グルコース-1,6-ジホスフェート、6ユニット/mlホスホグルコムターゼ(ウサギ筋肉由来、ベーリンガーマンハイム社製)、6ユニット/ml グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(*Leuconostoc mesenteroides*由来、ベーリンガーマンハイム社製))を添加し、37℃で30分間保温した後、340nmの吸光度を測定した。

【0091】この結果、反応2時間後まで、ほぼ直線的にグルコース-1-リン酸が増加し、最終的に14mMに達した(図8)。このときのデンプン分解率は約45.3%であった。ホスホリラーゼはα-グルカンの非還元末端から作用し、α-1,6-グルコシド結合の4残基手前で反応が停止するので、本実験では分解反応はほぼ完全に終了していると判断した。

【0092】(実施例7：アミロースの生産) 実施例3で調製した耐熱性ホスホリラーゼと終濃度250mM、または400mMのグルコース-1-リン酸とを60℃で反応させた。反応は10mMのクエン酸緩衝液(pH7.0)中で行い、酵素濃度は0.85ユニット/mlであり、終濃度の0.1mMのマルトペンタオースを反応プライマーとして用いた。経時的にサンプリングし、100℃で5分間加熱した後に、前述のSahekiらの方法により生じたリン酸を定量した。生じるアミ

ロースの分子量は、下の反応式を式(1)とを用いることによって、算出した。

【0093】



ここで、G-1-Pはグルコース-1-リン酸であり、G(5)はマルトペンタオース(5は重合度を表す)であり、G(5+n)は生じるアミロース(5+nは重合度を表す)である。

【0094】式(1)：生成物の平均重合度=(生じるリン酸のモル数/初発マルトペンタオロースのモル数)+5

反応の経時経過を図9に示す。60℃でも長時間十分に反応は進行し、生成物の沈澱も生じなかった。24時間後の反応液をゲル濾過クロマトグラフィー(Superose6+Superdex30(Pharmacia製、1cm×30cm)、溶出液150mM NaCl、検出器差屈折計)にかけ、酵素合成アミロース(アジノキ社製)を基準として、重合度を算定した。その結果、グルコース濃度が250mMの場合、重合度261のアミロース、およびグルコース濃度が400mMの場合、重合度196のアミロースが生成されており、予想される大きさのアミロースが生成されたことが明らかとなった。

【0095】(実施例8：短鎖長アミロースを基質としたグルコース-1-リン酸の生産) 実施例3で調製した耐熱性ホスホリラーゼを以下の反応液中で反応した。反応液組成は、0.2%または2%の短鎖長アミロース(ナカライテスク(株)製 AmyloseA (平均鎖長18)、コーンスターチのα-1,6-結合を切断して乾燥した製品)、0.9Mリン酸カリウム、耐熱性ホスホリラーゼ0.04ユニット/ml(pH7.0)を含んだ。この反応液を60℃、65℃または70℃で18時間保温した後、終濃度0.8規定となるように水酸化ナトリウムを添加して反応を停止し、生じたグルコース-1-リン酸を実施例6と同様の方法で測定した。

【0096】また対照実験として、ウサギ筋肉ホスホリラーゼ(a型、Sigma社製)を用い、反応温度を30℃にした以外は同様の条件で行った。2%の基質濃度では反応初期(反応開始後、30分以内)に基質が沈澱を始め、反応が停止した。そのため、酵素を0.4ユニット/mlに増加し、反応温度を40℃として実験を行った。これらの結果を表1に示す。ホスホリラーゼによる加リン酸分解は、マルトテトラオースまでで止まるため、理論的限界収率は78%である。

【0097】後者の条件では、基質の沈澱は観測されなかったものの、耐熱性ホスホリラーゼを使用した場合のほうがグルコース-1-リン酸の収率が高くその値は、60℃、65℃および70℃において61%～68%であった(表1)。

【0098】

【表1】

	17				18
	反応温度	酵素濃度	基質濃度	G-1-P量	G-1-P収率
	(℃)	(U/ml)	(%)	(mM)	(%)
ウサギ筋肉ホスホリラーゼ	30	0.04	0.2	0.088	0.71
ウサギ筋肉ホスホリラーゼ	30	0.04	2	1.84	1.49
ウサギ筋肉ホスホリラーゼ	40	0.4	0.2	6.33	51
ウサギ筋肉ホスホリラーゼ	40	0.4	2	67.1	54
耐熱性ホスホリラーゼ	60	0.04	0.2	8.31	67
耐熱性ホスホリラーゼ	80	0.04	2	83.9	68
耐熱性ホスホリラーゼ	85	0.04	0.2	7.80	63
耐熱性ホスホリラーゼ	65	0.04	2	79.0	64
耐熱性ホスホリラーゼ	70	0.04	0.2	7.50	61
耐熱性ホスホリラーゼ	70	0.04	2	79.2	64

## 【0099】

【発明の効果】本願発明の酵素は、今までに発見された中で最も耐熱性の高いホスホリラーゼであり、前述の実施例で示されるように、反応至適温度が50℃であり、60℃でも十分に使用し得る。また比活性も大腸菌グリコーゲンホスホリラーゼの少なくとも9倍である。従って、グルコース-1-リン酸を効率よく製造する際に問題となる、反応温度が低いために生じる雑菌の汚染およびα-グルカンの老化、またはホスホリラーゼの逆反応を利用してアミロースなどのα-グルカンを製造する際にも同様に問題となる、雑菌汚染や生産物であるα-グルカンの老化を、この耐熱性の酵素を使用することにより高い反応温度で行い得るようになり、克服することが可能となった。

【0100】さらに本酵素遺伝子が大腸菌などの中温菌を宿主として発現させた場合、耐熱性ホスホリラーゼを含む得られた菌体抽出液を60℃で加熱処理することにより、夾雑酵素を簡単に除去し得、精製の面においても有利であり得る。

## 【0101】

## 【配列表】

## 【0102】

## 【配列番号1】

配列の長さ：798

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

## 配列

```

Met Phe Thr Asp Lys Glu Thr Phe Lys Gln Ala Phe Leu Ile Arg Leu
1           5           10           15
Glu Thr Leu Cys Gly Lys Gln Phe Glu Glu Ser Thr Thr Arg Asp His
           20           25           30
Tyr Tyr Val Leu Gly His Met Val Arg Glu His Ile Ser Arg His Trp
           35           40           45
Ile Ala Thr Asn Glu Arg Asn Arg Ala Gln Lys Arg Lys Gln Val Tyr
           50           55           60
Tyr Leu Ser Ile Glu Phe Leu Leu Gly Arg Leu Leu Gly Ser Asn Leu
65           70           75           80
Leu Asn Leu Gly Val Arg Gln Val Val Glu Glu Gly Leu Arg Asp Leu
           85           90           95
Gly Ile Arg Leu Glu Asp Val Glu Glu Ser Glu Ala Asp Ala Gly Leu
           100          105          110
Gly Asn Gly Gly Leu Gly, Arg Leu Ala Ala Cys Phe Leu Asp Ser Leu
           115          120          125
Ala Thr Leu Asn Leu Pro Gly His Gly His Gly Ile Arg Tyr Lys His
           130          135          140
Gly Leu Phe Asp Gln Lys Ile Val Asp Gly Tyr Gln Val Glu Leu Pro
145          150          155          160
Gln Gln Trp Leu Arg His Gly Asn Val Trp Glu Ile Arg Lys Glu Glu
           165          170          175

```

19		20
Leu Ala Val Glu Val Asn Phe Trp Gly Lys Val Glu Val Tyr Glu Gln		
180	185	190
Asn Gly Cys Leu Val Phe Arg His Ile Asp Ser Lys Lys Val Met Ala		
195	200	205
Val Pro Tyr Asp Met Pro Val Ile Gly Tyr Gly Thr Asn Thr Val Asn		
210	215	220
Thr Leu Arg Leu Trp Asn Ala Glu Pro Ala Lys Thr Phe Pro Leu His		
225	230	235
Lys Asp Val Met Gln Tyr Lys Arg Glu Thr Glu Ala Ile Ser Glu Phe		
245	250	255
Leu Tyr Pro Asp Asp Ala His Asp Glu Gly Lys Ile Leu Arg Leu Lys		
260	265	270
Gln Gln Tyr Phe Leu Val Ala Ala Ser Leu Gly Ser Ile Val Arg Ala		
275	280	285
His Arg Leu Gln His Gly Asn Leu His Gln Leu His Glu Tyr Val Ala		
290	295	300
Ile His Val Asn Asp Thr His Pro Val Leu Ala Ile Pro Glu Leu Met		
305	310	315
Arg Ile Leu Leu Asp Glu Glu Gly Met Ser Trp Glu Glu Ala Trp His		
325	330	335
Ile Thr Thr His Thr Ile Ala Tyr Thr Asn His Thr Thr Leu Ser Glu		
340	345	350
Arg Leu Arg Met Ala Ile His Leu Phe Gln Pro Leu Leu Pro Arg Ile		
355	360	365
Tyr Met Ile Val } Glu Glu Ile Asn Glu Arg Phe Cys Arg Glu Leu Trp		
370	375	380
Glu Arg Tyr Pro Gly Asp Trp Gly Arg Ile Glu Gln Met Ala Ile Ile		
385	390	395
Ala His Gly Val Val Lys Met Ala His Leu Ala Ile Ala Gly Ser His		
405	410	415
Ser Val Asn Gly Val Ala Lys Leu His Thr Glu Ile Leu Lys Gln Arg		
420	425	430
Glu Met Arg Leu Phe Tyr Glu Trp Ala Pro His Lys Phe Asn Asn Lys		
435	440	445
Thr Asn Gly Val Thr His Arg Arg Trp Leu Leu Lys Ala Asn Pro Glu		
450	455	460
Leu Ser Ala Leu Ile Thr Asp Thr Thr Gly Ser Arg Trp Ile His Glu		
465	470	475
Pro Glu Thr Leu Ile Glu Leu Lys Pro His Ala Ser Asp Pro Ala Phe		
485	490	495
Gln Gln Ala Leu Ser Ala Val Lys Gln Gln Arg Lys Gly Lys Leu Ala		
500	505	510
Ala Arg Ile Tyr Glu Lys Thr Gly Ile Arg Val Asp Glu Ser Ser Ile		
515	520	525
Phe Asp Val Gln Val Lys Arg Leu His Ala Tyr Lys Arg Gln Leu Leu		
530	535	540
Asn Val Leu His Ile Met Tyr Leu Tyr Asn Arg Leu Lys Glu Asp Pro		
545	550	555
His Phe Ser Ile Tyr Pro Arg Thr Phe Ile Phe Gly Ala Lys Ala Ser		
565	570	575

2122

Pro Gly Tyr Tyr Tyr Ala Lys Arg Ile Ile Lys Leu Ile His Ser Val

580585590

Ala Asp Lys Val Asn Asn Asp Lys Gln Thr Asn Glu Gln Leu Lys Val

595600605

Ile Phe Leu Glu Asn Tyr Arg Val Ser Leu Ala Glu Glu Ile Phe Pro

610615620

Ala Ala Asp Val Ser Glu Gln Ile Ser Thr Ala Ser Ile Glu Ala Ser

625630635640

Gly Thr Gly Asn Met Lys Phe Met Met Asn Gly Ala Leu Thr Leu Gly

645650655

Thr Leu Asp Gly Ala Asn Val Glu Ile Ala Glu Ala Val Gly Lys Glu

660665670

Asn Met Phe Leu Phe Gly Leu Thr Ala Glu Glu Val Leu Asn Tyr Tyr

675680685

Glu His Gly Gly Tyr Arg Ala His Glu Tyr Tyr His His Asp Lys Arg

690695700

Ile Lys Gln Val Val Asp Gln Leu Val Asn Gly Phe Phe Pro Asp Val

705710715720

Ala Asp Tyr Phe Glu Pro Ile Tyr Asp Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asp

725730735

Glu Tyr Phe Val Leu Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Thr Glu Ala His Glu

740745750

Arg Val Glu Ala Ala Tyr Arg Asp Pro Ala Arg Trp Trp Tyr Met Ser

755760765

Ala Val Asn Ile Ala His Ser Gly Tyr Phe Ala Ser Asp Arg Thr Ile

770775780

Ala Glu Tyr Ala Val Asp Ile Trp Gly Ile Ser Pro Ser Met

785790795798

【0103】  
【配列番号2】  
配列の長さ：29  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸(合成DNA)

配列  
CTTGAATTCA CAAGCCTATG AACAGCTGA

29

【0104】  
【配列番号3】  
配列の長さ：29  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸(合成DNA)

配列  
CTTCTGCAGA CTTCTTGACT GGTGCGCAA

29

【0105】  
【配列番号4】  
配列の長さ：2580  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：Genomic DNA  
起源  
生物名：バチルス ステアロサーモフィラス  
株名：TRBE14

配列  
GTTGGCGTCG GTCGGCAAAC CAATATAAAC AAGCCTATGA ACAGCTGATC AAAAAGGAGG 60  
AGCACACGC TTG TTC ACG GAT AAA GAA ACG TTT AAA CAG GCG TTT TTG ATA 111  
Met Phe Thr Asp Lys Glu Thr Phe Lys Gln Ala Phe Leu Ile



23	24	
CGG CTT GAA ACG TTG TGC GGC AAA CAG TTC GAG GAG TCG ACC ACG CGC	159	
Arg Leu Glu Thr Leu Cys Gly Lys Gln Phe Glu Glu Ser Thr Thr Arg		
15 20 25 30		
GAC CAT TAT TAT GTG CTT GGT CAT ATG GTA CGT GAA CAT ATT AGC CGC	207	
Asp His Tyr Tyr Val Leu Gly His Met Val Arg Glu His Ile Ser Arg		
35 40 45		
CAT TGG ATC GCC ACG AAT GAG CGC AAT CGG GCG CAA AAG CGG AAG CAA	255	
His Trp Ile Ala Thr Asn Glu Arg Asn Arg Ala Gln Lys Arg Lys Gln		
50 55 60		
GTG TAT TAT TTG TCG ATC GAG TTT TTA TTG GGC CGG TTG CTC GGC AGC	303	
Val Tyr Tyr Leu Ser Ile Glu Phe Leu Leu Gly Arg Leu Leu Gly Ser		
65 70 75		
AAC TTA TTA AAC CTT GGT GTC CGT CAG GTC GTT GAA GAG GGG CTT CGC	351	
Asn Leu Leu Asn Leu Gly Val Arg Gln Val Val Glu Glu Gly Leu Arg		
80 85 90		
GAT CTC GGC ATT CGT CTT GAA GAT GTC GAG GAG AGC GAG GCG GAT GCC	399	
Asp Leu Gly Ile Arg Leu Glu Asp Val Glu Glu Ser Glu Ala Asp Ala		
95 100 105 110		
GGG CTT GGC AAC GGC GGA CTC GGG CGG CTC GCC GCC TGT TTT CTC GAT	447	
Gly Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly Arg Leu Ala Ala Cys Phe Leu Asp		
115 120 125		
TCG CTG GCG ACG TTG AAT TTG CCG GGC CAT GGC CAT GGC ATC CGC TAT	495	
Ser Leu Ala Thr Leu Asn Leu Pro Gly His Gly His Gly Ile Arg Tyr		
130 135 140		
AAA CAC GGG CTG TTT GAC CAA AAG ATC GTC GAT GGC TAT CAA GTC GAG	543	
Lys His Gly Leu Phe Asp Gln Lys Ile Val Asp Gly Tyr Gln Val Glu		
145 150 155		
CTG CCT CAG CAA TGG CTG CGC CAC GGA AAC GTT TGG GAA ATA CGA AAA	591	
Leu Pro Gln Gln Trp Leu Arg His Gly Asn Val Trp Glu Ile Arg Lys		
160 165 170		
GAG GAG CTG GCT GTC GAG GTC AAT TTT TGG GGG AAG GTT GAG GTG TAC	639	
Glu Glu Leu Ala Val Glu Val Asn Phe Trp Gly Lys Val Glu Val Tyr		
175 180 185 190		
GAA CAA AAC GGG TGC CTC GTC TTC CGC CAT ATC GAC AGC AAA AAA GTG	687	
Glu Gln Asn Gly Cys Leu Val Phe Arg His Ile Asp Ser Lys Lys Val		
195 200 205		
ATG GCG GTG CCA TAC GAC ATG CCC GTG ATC GGC TAC GGG ACG AAC ACG	735	
Met Ala Val Pro Tyr Asp Met Pro Val Ile Gly Tyr Gly Thr Asn Thr		
210 215 220		
GTC AAT ACG CTG CGG CTT TGG AAC GCG GAG CCG GCG AAA ACG TTC CCG	783	
Val Asn Thr Leu Arg Leu Trp Asn Ala Glu Pro Ala Lys Thr Phe Pro		
225 230 235		
CTT CAT AAG GAT GTC ATG CAA TAC AAG CGG GAG ACA GAA GCA ATT TCC	831	
Leu His Lys Asp Val Met Gln Tyr Lys Arg Glu Thr Glu Ala Ile Ser		
240 245 250		
GAA TTT TTA TAC CCG GAT GAT GCG CAT GAC GAA GGG AAA ATT TTG CGC	879	
Glu Phe Leu Tyr Pro Asp Asp Ala His Asp Glu Gly Lys Ile Leu Arg		
255 260 265 270		
TTG AAG CAG CAA TAT TTT CTC GTG GCC GCC AGC CTT GGC AGC ATC GTG	927	
Leu Lys Gln Gln Tyr Phe Leu Val Ala Ala Ser Leu Gly Ser Ile Val		

25		26
	275	280
CGC GCC CAT CGC CTT CAG CAC GGG AAC CTA CAC CAG CTT CAT GAA TAT		285
Arg Ala His Arg Leu Gln His Gly Asn Leu His Gln Leu His Glu Tyr		
290	295	300
GTC GCC ATT CAT GTA AAC GAC ACT CAT CCG GTG TTG GCG ATT CCG GAA		
Val Ala Ile His Val Asn Asp Thr His Pro Val Leu Ala Ile Pro Glu		
305	310	315
CTA ATG CGC ATT TTG CTC GAT GAG GAA GGC ATG AGT TGG GAA GAA GCG		
Leu Met Arg Ile Leu Leu Asp Glu Glu Gly Met Ser Trp Glu Glu Ala		
320	325	330
TGG CAC ATT ACG ACC CAT ACG ATC GCT TAC ACA AAC CAT ACG ACG TTA		
Trp His Ile Thr Thr His Thr Ile Ala Tyr Thr Asn His Thr Thr Leu		
335	340	345
TCC GAG CGC TTG AGA ATG GCG ATT CAT TTA TTT CAG CCG CTC TTG CCG		
Ser Glu Arg Leu Arg Met Ala Ile His Leu Phe Gln Pro Leu Leu Pro		
355	360	365
CGC ATT TAT ATG ATC GTC GAG GAA ATT AAC GAA CGA TTT TGC CGT GAG		
Arg Ile Tyr Met Ile Val Glu Glu Ile Asn Glu Arg Phe Cys Arg Glu		
370	375	380
CTA TGG GAA CGC TAC CCC GGC GAT TGG GGG CGG ATT GAA CAA ATG GCC		
Leu Trp Glu Arg Tyr Pro Gly Asp Trp Gly Arg Ile Glu Gln Met Ala		
385	390	395
ATT ATC GCC CAT GGC GTG GTG AAA ATG GCG CAT TTG GCC ATC GCC GGC		
Ile Ile Ala His Gly Val Val Lys Met Ala His Leu Ala Ile Ala Gly		
400	405	410
AGC CAT AGC GTC AAC GGA GTG GCG AAG CTG CAT ACA GAA ATT TTG AAA		
Ser His Ser Val Asn Gly Val Ala Lys Leu His Thr Glu Ile Leu Lys		
415	420	425
CAG CGG GAA ATG CGC TTG TTT TAC GAA TGG GCG CCG CAC AAG TTT AAC		
Gln Arg Glu Met Arg Leu Phe Tyr Glu Trp Ala Pro His Lys Phe Asn		
435	440	445
AAT AAA ACG AAC GGG GTG ACG CAT CGA CGT TGG CTG TTA AAA GCG AAC		
Asn Lys Thr Asn Gly Val Thr His Arg Arg Trp Leu Leu Lys Ala Asn		
450	455	460
CCC GAG CTG TCG GCG TTG ATT ACC GAC ACG ACC GGT TCG CGC TGG ATT		
Pro Glu Leu Ser Ala Leu Ile Thr Asp Thr Thr Gly Ser Arg Trp Ile		
465	470	475
CAC GAG CCG GAA ACA CTG ATC GAG CTG AAA CCG CAT GCC TCC GAT CCG		
His Glu Pro Glu Thr Leu Ile Glu Leu Lys Pro His Ala Ser Asp Pro		
480	485	490
GCG TTC CAG CAG GCG CTT TCG GCC GTT AAG CAG CAG CGC AAA GGC AAG		
Ala Phe Gln Gln Ala Leu Ser Ala Val Lys Gln Gln Arg Lys Gly Lys		
495	500	505
CTC GCT GCC CGC ATT TAT GAA AAG ACC GGG ATC CGT GTT GAT GAG TCG		
Leu Ala Ala Arg Ile Tyr Glu Lys Thr Gly Ile Arg Val Asp Glu Ser		
515	520	525
TCC ATC TTT GAT GTG CAA GTG AAG CGG CTG CAC GCC TAC AAA CGA CAG		
Ser Ile Phe Asp Val Gln Val Lys Arg Leu His Ala Tyr Lys Arg Gln		
530	535	540
CTG TTG AAT GTA CTG CAC ATT ATG TAT CTA TAC AAT CGT CTA AAA GAA		

975

1023

1071

1119

1167

1215

1263

1311

1359

1407

1455

1503

1551

1699

1647

1695

1743

27		28
Leu Leu Asn Val Leu His Ile Met Tyr Leu Tyr Asn Arg Leu Lys Glu		
545	550	555
GAC CCG CAC TTC TCG ATT TAC CCA CGC ACG TTC ATC TTC GGA GCG AAA		1791
Asp Pro His Phe Ser Ile Tyr Pro Arg Thr Phe Ile Phe Gly Ala Lys		
560	565	570
GCG TCG CCT GGC TAC TAT TAC GCC AAG CGA ATC ATT AAG CTG ATT CAT		1839
Ala Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr Ala Lys Arg Ile Ile Lys Leu Ile His		
575	580	585
TCG GTT GCC GAT AAG GTG AAC AAT GAC AAA CAG ACG AAC GAG CAG CTC		1887
Ser Val Ala Asp Lys Val Asn Asn Asp Lys Gln Thr Asn Glu Gln Leu		
595	600	605
AAA GTC ATT TTT TTA GAA AAC TAT CGC GTG TCG CTT GCG GAG GAA ATT		1935
Lys Val Ile Phe Leu Glu Asn Tyr Arg Val Ser Leu Ala Glu Glu Ile		
610	615	620
TTC CCG GCT GCT GAT GTG AGC GAA CAA ATT TCA ACC GCG AGC ATA GAG		1983
Phe Pro Ala Ala Asp Val Ser Glu Gln Ile Ser Thr Ala Ser Ile Glu		
625	630	635
GCG TCC GGG ACG GGC AAC ATG AAA TTT ATG ATG AAC GGG GCG CTC ACG		2031
Ala Ser Gly Thr Gly Asn Met Lys Phe Met Met Asn Gly Ala Leu Thr		
640	645	650
CTC GGA ACG CTC GAT GGA GCG AAC GTC GAA ATC GCT GAA GCG GTC GGA		2079
Leu Gly Thr Leu Asp Gly Ala Asn Val Glu Ile Ala Glu Ala Val Gly		
655	660	665
AAA GAA AAT ATG TTT TTG TTC GGG CTG ACC GCC GAA GAA GTG CTG AAC		2127
Lys Glu Asn Met Phe Leu Phe Gly Leu Thr Ala Glu Glu Val Leu Asn		
675	680	685
TAC TAC GAA CAC GGC GGT TAC CGG GCG CAT GAA TAT TAC CAC CAC GAC		2175
Tyr Tyr Glu His Gly Gly Tyr Arg Ala His Glu Tyr Tyr His His Asp		
690	695	700
AAA CGG ATT AAA CAA GTG GTC GAT CAA CTT GTG AAC GGC TTT TTC CCT		2223
Lys Arg Ile Lys Gln Val Val Asp Gln Leu Val Asn Gly Phe Phe Pro		
705	710	715
GAT GTT GCT GAT TAC TTT GAG CCG ATT TAC GAC TCC TTG CTG ACG CAA		2271
Asp Val Ala Asp Tyr Phe Glu Pro Ile Tyr Asp Ser Leu Leu Thr Gln		
720	725	730
AAC GAC GAA TAT TTC GTT CTG CGC GAC TTT GCC GCT TAT ACC GAA GCG		2319
Asn Asp Glu Tyr Phe Val Leu Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Thr Glu Ala		
735	740	745
CAT GAG CGG GTG GAG GCC GCT TAC CGC GAC CCG GCA CGC TGG TGG TAT		2367
His Glu Arg Val Glu Ala Ala Tyr Arg Asp Pro Ala Arg Trp Trp Tyr		
755	760	765
ATG AGC GCG GTC AAC ATC GCG CAC TCC GGC TAC TTT GCA AGC GAC CGG		2415
Met Ser Ala Val Asn Ile Ala His Ser Gly Tyr Phe Ala Ser Asp Arg		
770	775	780
ACG ATC GCC GAG TAC GCC GTC GAT ATT TGG GGC ATT TCA CCA TCG ATG		2463
Thr Ile Ala Glu Tyr Ala Val Asp Ile Trp Gly Ile Ser Pro Ser Met		
785	790	795
TGAGGCAAAA GCAAAATCAA GGGCGGTTGC GCACCACTCA AGAAGTTTGG TGAATCACGG		2523
TTGCTGACCT TGATTGGGCG GCAACGGCAT GAACAGAAAA GAGACGTTCT GAACCAA		2580

【図面の簡単な説明】

【図1】ホスホリラーゼを用いたG-1-Pの生成、および

サイクロアミロース生成の概念を示す模式図である。

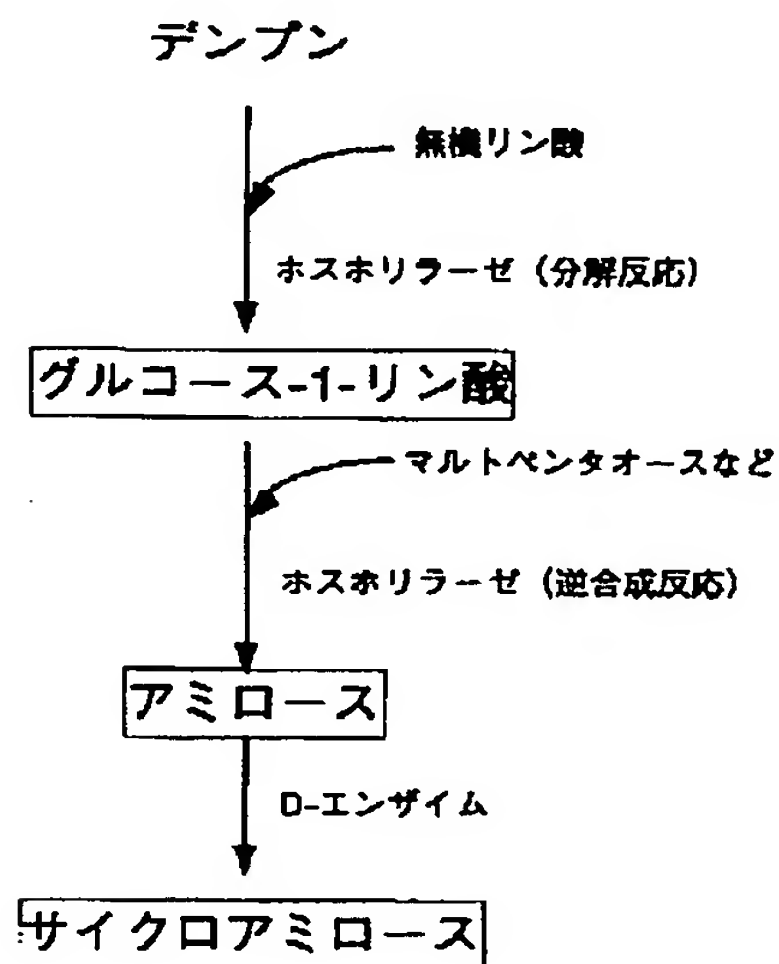
【図2】(a)はバチルスサチルス由来のグリコーゲン合成系遺伝子群を示し、(b)はバチルスステアロサーモフィラスTRBE14株由来のグリコーゲン合成系遺伝子群を示す。

【図3】精製した耐熱性ホスホリラーゼをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動した結果を示す。

【図4】耐熱性ホスホリラーゼの至適pHを示したグラフである。

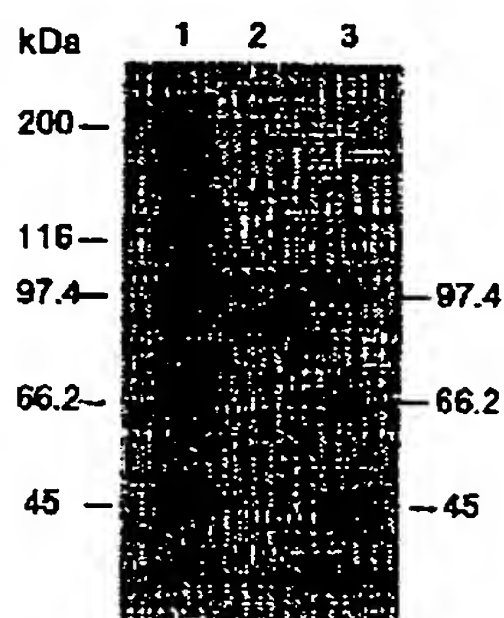
【図5】耐熱性ホスホリラーゼのpH安定性を示したグラフである。

【図1】



【図3】

耐熱性ホスホリラーゼのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動



レーン1: 分子量マーカー  
レーン2: 耐熱性ホスホリラーゼ  
レーン3: 分子量マーカー

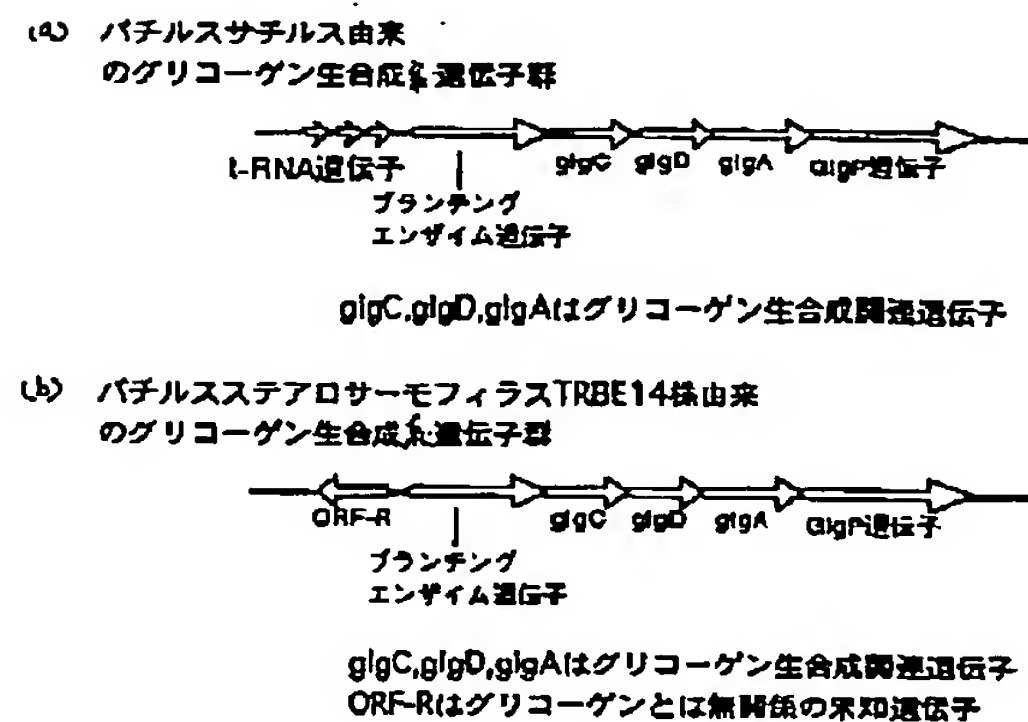
【図6】耐熱性ホスホリラーゼの反応至適温度を示したグラフである。

【図7】耐熱性ホスホリラーゼの耐熱性を示したグラフである。

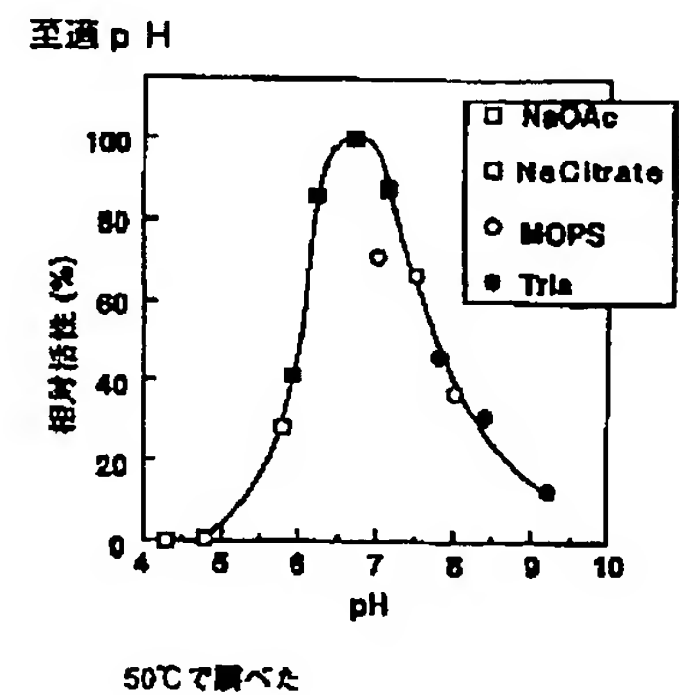
【図8】耐熱性ホスホリラーゼを用い、モチトウモロコシデンプンからのグルコース-1-リン酸の生産を経時的に定量したグラフである。

【図9】耐熱性ホスホリラーゼを用い、グルコース-1-リン酸からのアミロースの生産を経時的に定量したグラフである。

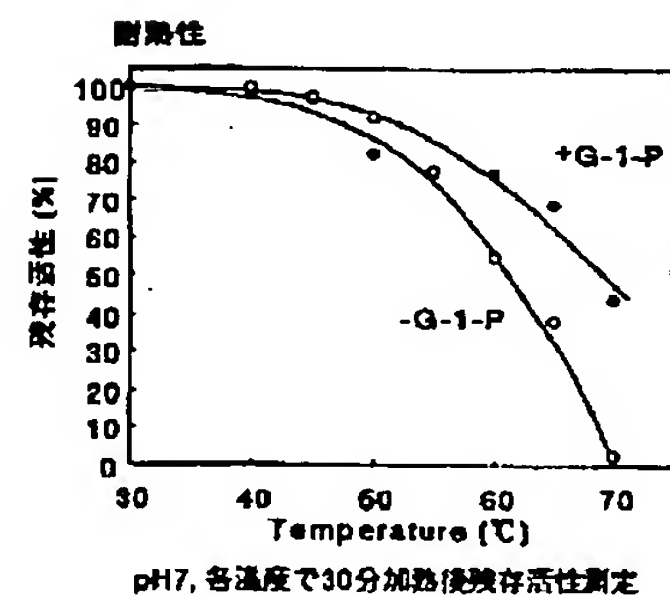
【図2】



【図4】

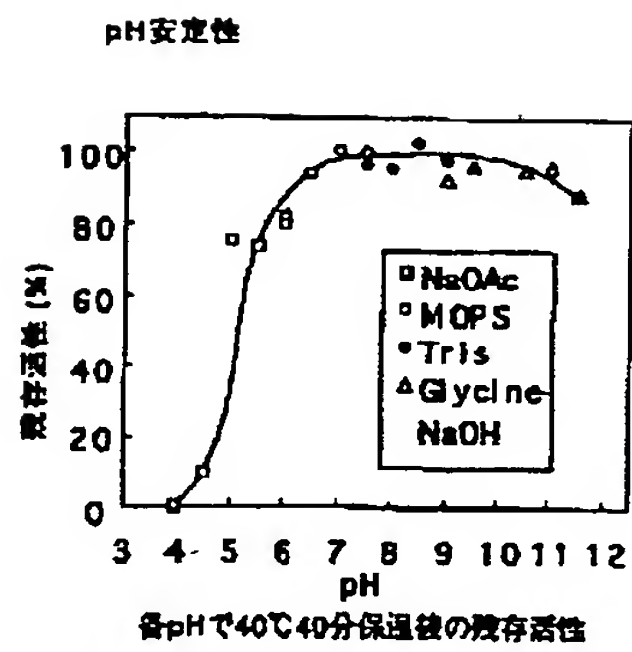


【図7】

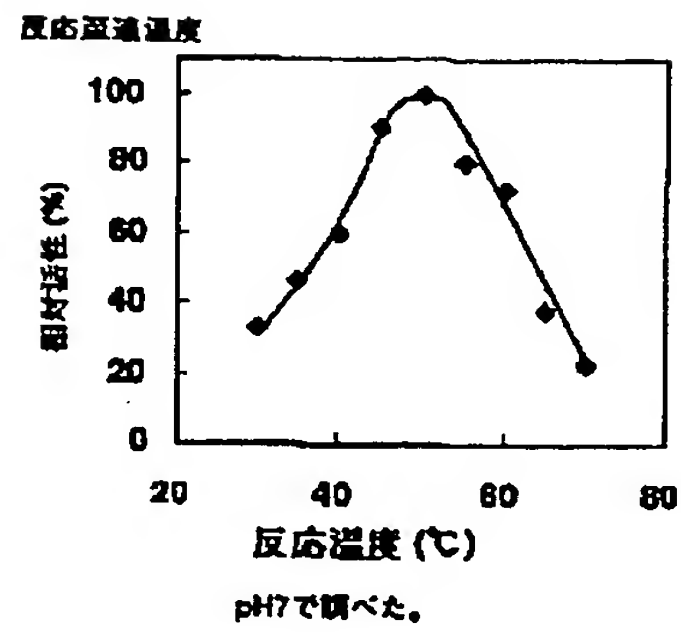




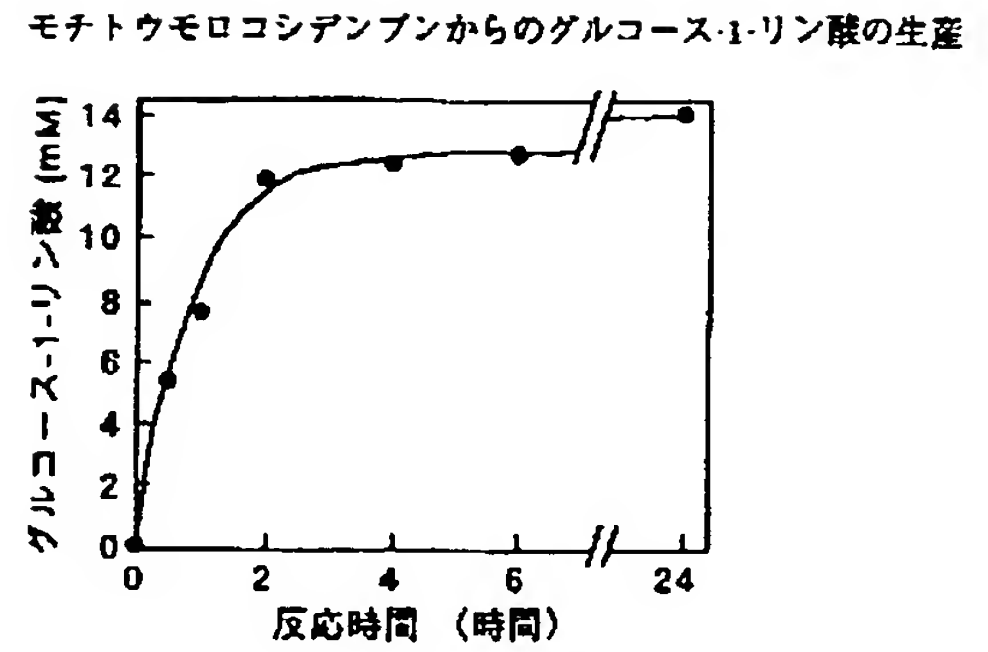
【図5】



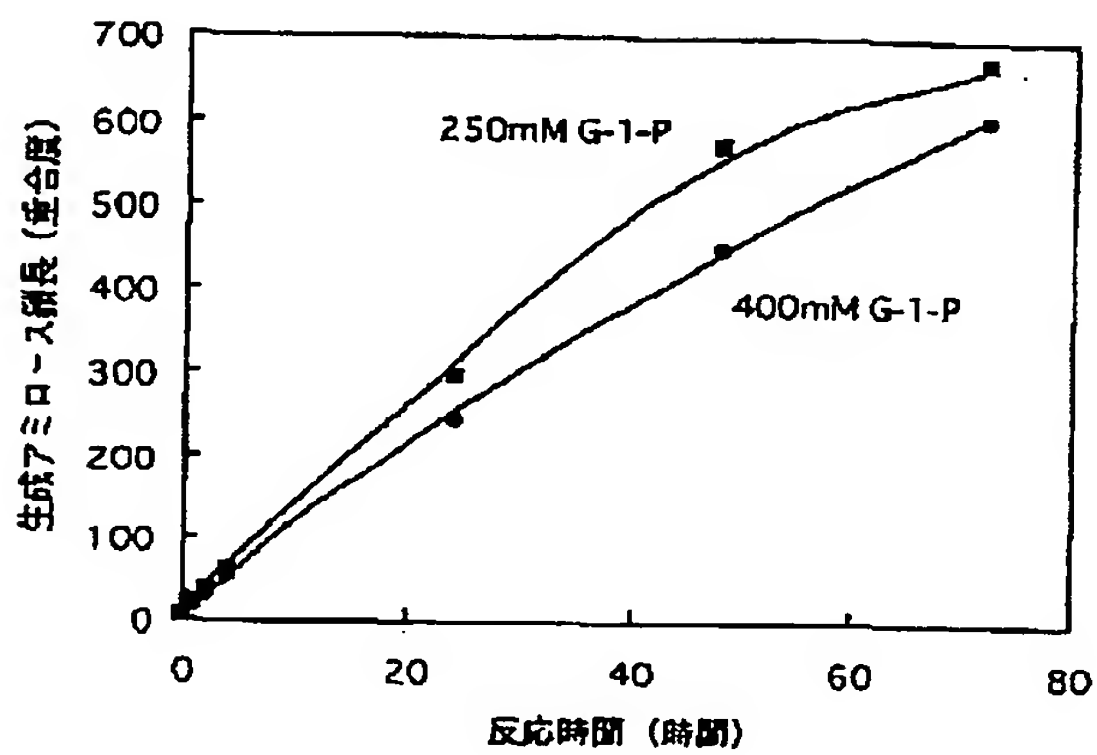
【図6】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:19)

(54) 【発明の名称】 耐熱性ホスホリラーゼ、およびその製造方法

(71) 出願人 江崎グリコ株式会社

大阪府大阪市西淀川区歌島4丁目6番5号

(21) 出願番号	特願平8-176231	(51) Int. Cl6	識別記号	F I	技術表示箇所
(22) 出願日	平成8年(1996)7月5日	C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00 ZNA A	
		9/10		9/10	
		//(C12N 15/09	ZNA		
		C12R 1:07			
		(C12N 9/10			

## (57) 【要約】

【課題】 耐熱性ホスホリラーゼを提供すること、およびそれを利用したグルコース-1-リン酸または $\alpha$ -グルカンの製造方法の確立

【解決手段】 耐熱性ホスホリラーゼをコードする遺伝子を単離し、高発現可能な発現ベクターに挿入し、大腸菌で発現させることにより、耐熱性ホスホリラーゼを単離する。単離は菌体抽出液を60℃で加熱処理し、遠心分離することにより簡単に行われる。耐熱性ホスホリラーゼを用いて60℃以上の温度で反応させることにより老化と雑菌汚染を伴わない、グルコース-1-リン酸および $\alpha$ -グルカンの製造方法が提供される。

【発明の属する技術分野】 本願発明は、新規な耐熱性のホスホリラーゼ、このホスホリラーゼをコードする遺伝子、このホスホリラーゼを発現する発現ベクター、このホスホリラーゼの製造方法、および耐熱性のホスホリラーゼを用いるグルコース-1-リン酸ならびに $\alpha$ -グルカンの製造方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ホスホリラーゼであって以下の性質：

- 1) 基質特異性： $\alpha$ -1,4-グルカンまたはグルコース-1-リン酸；
- 2) 至適温度：50℃；
- 3) 耐熱性：60℃においても耐熱性であり；および
- 4) pH安定性：pH6.5～11；を有する、ホスホリラーゼ。

【請求項2】 配列表の配列番号1の1位のMetから798位のMetまでのアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のホスホリラーゼ。

【請求項3】 配列表の配列番号1の1位のMetから798位のMetまでのアミノ酸配列中の1またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換、あるいは付加による変異を有する

ホスホリラーゼであって、該変異を含むホスホリラーゼが、該変異を含まないホスホリラーゼと同等またはそれ以上の比活性および耐熱性を有する、請求項1に記載のホスホリラーゼ。

【請求項4】 前記ホスホリラーゼが、バチルス ステアロサーモフィラスTRBE14株由来である、請求項1に記載のホスホリラーゼ。

【請求項5】 請求項2または3のいずれかの項に記載のホスホリラーゼであって、比活性が大腸菌ホスホリラーゼよりも高い、ホスホリラーゼ。

【請求項6】 前記比活性が大腸菌グリコーゲンホスホリラーゼの少なくとも9倍である、請求項2または3のいずれかの項に記載のホスホリラーゼ。

【請求項7】 配列表の配列番号1の1位のMetから798位のMetまでのアミノ酸配列をコードする配列を含む、ホスホリラーゼ遺伝子。

【請求項8】 前記ホスホリラーゼ遺伝子が配列表の配列番号4に記載のDNA配列である、ホスホリラーゼ遺伝子。

(続き有)